

2



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 33/00, G01N 33/84</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/28810</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. August 1997 (14.08.97)</p>		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/00482</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Februar 1997 (03.02.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 04 361.1 7. Februar 1996 (07.02.96) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHWARZ PHARMA AG [DE/DE]; Alfred-Nobel-Strasse 10, D-40789 Monheim (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KELM, Malte [DE/DE]; Christophstrasse 71, D-40225 Düsseldorf (DE).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: SCHWARZ PHARMA AG; Alfred-Nobel-Strasse 10, D-40789 Monheim (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, CN, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/00482</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Februar 1997 (03.02.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 04 361.1 7. Februar 1996 (07.02.96) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHWARZ PHARMA AG [DE/DE]; Alfred-Nobel-Strasse 10, D-40789 Monheim (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KELM, Malte [DE/DE]; Christophstrasse 71, D-40225 Düsseldorf (DE).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: SCHWARZ PHARMA AG; Alfred-Nobel-Strasse 10, D-40789 Monheim (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, CN, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/00482</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Februar 1997 (03.02.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 04 361.1 7. Februar 1996 (07.02.96) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHWARZ PHARMA AG [DE/DE]; Alfred-Nobel-Strasse 10, D-40789 Monheim (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KELM, Malte [DE/DE]; Christophstrasse 71, D-40225 Düsseldorf (DE).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: SCHWARZ PHARMA AG; Alfred-Nobel-Strasse 10, D-40789 Monheim (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, CN, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>			
<p>(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING NITRIC OXIDE</p> <p>(54) Bezeichnung: PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNG ENTHALTEND STICKSTOFFMONOXID</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a pharmaceutical composition of a sterile, injectable physiologically acceptable solution containing nitric oxide (NO). The invention also concerns a process for preparing this composition and a process for detecting physiologically present NO. With the NO solution according to the invention, NO in high doses can trigger locally in vessels (for example coronary vessels) specific local biological effects such as relaxation of the smooth vascular musculature, inhibition of the adhesion of thrombocytes, etc., without producing systemic side-effects, such as for example a critical drop in blood pressure, in spite of the high doses. The detection process according to the invention enables the presence of an endothelial dysfunction to be established from the whole blood of humans and other mammals.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung einer sterilen, injizierbaren physiologisch annehmbaren Lösung mit einem Gehalt an Stickstoffmonoxid (NO), Verfahren zu deren Herstellung sowie ein Detektionsverfahren für physiologisch präsent NO. Mit der erfindungsgemäßen NO-Lösung kann NO lokal in hohen Dosen in Gefäßen (z.B. Koronargefäß) gezielte lokale biologische Effekte auslösen, wie Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, Inhibition der Adhäsion von Thrombozyten etc., ohne daß es aufgrund hoher Dosen zu systemischen Begleiterscheinungen, wie z.B. einem kritischen Druckabfall kommt. Mit dem erfindungsgemäßen Detektionsverfahren kann am Vollblut von Menschen/Säugetern das Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion festgestellt werden.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNG ENTHALTEND STICKSTOFFMONOXID

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung einer sterilen, injizierbaren physiologisch annehmbaren Lösung mit einem Gehalt an Stickstoffmonoxid (NO), Verfahren zu deren Herstellung sowie ein Detektionsverfahren für physiologisch prä-

10

Physiologisch präsenten Stickstoffmonoxid (NO) kann durch verschiedene biologische Funktionen wesentliche Schlüsselprozesse in der Entwicklung der Arteriosklerose beeinflussen, wie die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, die Hemmung der Adhäsion von Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten an der Gefäßwand, die Inhibition der

15 Proliferation sekretorischer glatter Muskelzellen und die direkte Beeinflussung des endothelialen Stoffwechsels.

20

So konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, daß endotheliales Stickstoffmonoxid (NO) über eine Vielzahl von Mechanismen sowohl den Stoffwechsel als auch die Funktion der Gefäßwand beeinflusst:

1. es führt über Stimulation der löslichen Guanylatzyklase zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, und
- 25 2. es ist somit an einer Regulation des peripher vaskulären Widerstandes und arteriellen Blutdruckes beteiligt,
3. ferner hemmt es die Mitogenese und Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen,
- 30 4. es unterdrückt die Adhäsion von Thrombozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten an der Gefäßwand, und
5. es beeinflusst direkt den Stoffwechsel der Endothelzellen, z.B. durch eine veränderte Expression von Adhäsionsmolekülen an der Oberflächenmembran. Übersichten hierzu
- 35 finden sich bei

1. Moncada, S. and Higgs, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. N. Engl. J. Med. 329: 2002-2012, 1993.
- 5 2. Radomski, M.W. and Moncada, S. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. Thromb. Haemost. 70: 36-41, 1993.
3. Snyder, S.H. and Bredt, D.S. Biological roles of nitric oxide. Sci AM 266 (5): 68-77, 1992.
- 10 4. Gibbons, G.H. and Dzau, V.J. The emerging concept of vascular remodeling. N. Engl. J Med. 330: 1431-1438, 1994.

Sämtliche der genannten Prozesse stellen Schlüsselereignisse in der Entwicklung patholo-
15 gischer Gefäßwandveränderungen bei der Arteriosklerose dar. Anerkannte Risikofaktoren der Arteriosklerose, welche auch die endotheliale Funktion beeinflussen, sind: die arterielle Hypertonie, die Hyperlipoproteinämie, der Diabetes mellitus, ein Nikotinkonsum und mögli-
cherweise das Alter und Geschlecht (siehe: Moncada, S. and Higgs, A. The L-arginine-nitric
oxide pathway. N. Engl. J. Med. 329: 2002-2012, 1993; Ross, R. The pathogenesis of
20 atherosclerosis - an update. N. Engl. J. Med. 324 (No 8): 488-500, 1986; Safar, M.E. and Frohlich, E.D. The arterial system in hypertension. A prospective view. Hypertension 26: 10-14, 1995).

Der pathophysiologisch relevante Nachweis einer geänderten Aktivität der endothelialen
25 NO-Synthese gelang bis jetzt jedoch nur in experimentellen Ansätzen mit kultivierten Zellen oder isolierten Organkreisläufen, in denen eine Quantifizierung von NO bzw. seiner Abbau-
produkte möglich war. Am Menschen konnten diesbezüglich bisher jedoch nur phänomeno-
logische Befunde hinsichtlich einer veränderten Acetylcholin-induzierten Flußantwort in ver-
schiedenen Stromgebieten beschrieben werden, als indirekter Marker einer Endothel-ab-
30 hängigen Vasodilatation. Eine exakte Quantifizierung der Aktivität der endothelialen konsti-
tutiven NO-Synthase am Menschen als Indikator einer endothelialen Dysfunktion war bisher
nicht möglich.

Schließlich wurden in den vergangenen Jahrzehnten verschiedene Klassen von NO-Donoren zur Therapie arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen wie zum Beispiel der koronaren Herzerkrankung erfolgreich entwickelt und eingesetzt (Übersichten hierzu finden sich bei: Feelisch, M. The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovaso-
5 dilators: appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solutions. J. Cardiovasc. Pharmacol. 17 (suppl. 3): S25-S33, 1991; Feelisch M. and Noack, E. The vitro metabolism of nitrovasodilators and their conversion into vasoactive species. In: Heart Failure Mechanisms and Management, edited by Lewis,
10 B.S. and Kimchi, A., Springer: Berlin, Heidelberg, 1991, p.241-255; Harrison, D.G. and Bates, J.N. The nitrovasodilators. Circulation 87: 1461-1467, 1993; De Caterina, R. Nitrate als Thrombozytenfunktionshemmer. Z. Kardiol. 83: 463-473, 1994).

Die NO-Donoren wirken sowohl im arteriellen als auch im venösen Teil des Kreislaufes und beeinflussen NO-abhängig auch die Interaktion der Gefäßwand mit den korpuskulären Be-
15 standteilen des Blutes (Thrombozyten, neutrophile Granulozyten und Monozyten). Bis heute gibt es jedoch noch keine therapeutische Entwicklung, die es erlaubt, NO direkt in Form von authentischen NO-Lösungen am menschlichen Kreislauf einzusetzen. Dies mag in der äußerst raschen Metabolisierung und Inaktivierung von NO im menschlichen Kreislauf begrün-
20 det sein, was einerseits die erfolgreiche und zielgerechte Einbringung von NO in den menschlichen Kreislauf behindert, aber andererseits den Vorteil bietet, potential lokal sehr hohe NO-Dosen erzielen zu können, ohne systemisch begleitende Nebenwirkungen in Kauf nehmen zu müssen. Insbesondere letzterer Punkt erscheint im Hinblick auf die o.g. umfas-
25 sendenden antiarteriosklerotischen Eigenschaften von NO als äußerst relevant für sämtliche intravaskulären Interventionen an peripheren und koronaren Arterien.

In den Industriestaaten mit hoher Zivilisation wie USA und Deutschland werden derzeit jährlich über 370.000 koronare Interventionen (PTCA etc.) durchgeführt (siehe Gleichmann, U., Mannebach, H., and Lichtlen, P. 10. Bericht über Struktur und Leistungszahlen der Herz-
30 katheterlabors in der Bundesrepublik Deutschland. Z Kardiol 84:327-333, 1995).

Die initiale Erfolgsrate beträgt bis zu 90 %, in 10 % der PTCA's kommt es jedoch zu einem frühzeitigen Verschuß bzw. zu einer Trombusbildung. Darüber hinaus kommt es in 25 -
35 50 %, je nach Literaturangabe, zur Ausbildung einer Restenose in den ersten sechs Monaten nach dem Eingriff. Die Gesamtzahl aller weltweit durchgeführten Angioplastien wird für

das Jahr 2000 mit über einer Million veranschlagt, was wiederum bedeutet, daß mit bis zu 400.000 Restenosen jährlich zu rechnen ist. Diese Zahlen unterstreichen den dringenden Handlungsbedarf zur Senkung der akuten und langfristigen Restenoserate nach PTCA.

Systemische pharmakologische Interventionsstudien mit Kalziumantagonisten, organischen

5 Nitraten und ACE-Hemmern zeigten bis jetzt keinen Einfluß auf die Restenoserate. Auch die Entwicklung verschiedener mechanischer Alternativverfahren (direktionale Atherektomie, Laserangioplastie, Stent-Implantation, Rotablation) brachten keine allumfassende Senkung der Restenoserate, sondern blieben auf bestimmte Nischenindikationen begrenzt. Dies

führte in letzter Zeit zur Entwicklung neuer LDD-Systeme (local drug delivery), wie beschich-

10 tete Stentprothesen, dem Kaplan-Simpson-Infusionskatheter (Stanford University), dem Mikroinfusionskatheter (Cordis) oder dem porösen PTCA-Ballonkatheter (ACS). Mit diesen Systemen erscheint es erstmals möglich, lokal hohe Dosen eines Pharmakons in die Ge-

fäßwand der Koronararterien einzubringen. Aufgrund des raschen Metabolismus von NO im menschlichen Blut, erscheint es nun als äußerst wünschenswert und sinnvoll, NO lokal in

15 hohen Dosen während koronarer Interventionsmaßnahmen in das Koronargefäß einzubringen und somit an lokaler Stelle alle einleitend genannten biologischen Effekte von NO, wie Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, Inhibition der Adhäsion von Thrombozyten, neutrophilen Monozyten zu nutzen, ohne daß es aufgrund hoher Dosen zu systemischen Begleiterscheinungen, wie z.B. einem kritischen Druckabfall kommt.

20 Wie bereits einleitend erwähnt, stellen die arterielle Hypertonie, die Hyperlipoproteinämie und der Diabetes mellitus die wesentlichen atherogenen Risikofaktoren dar. Allein für die arterielle Hypertonie und ihre kardiovaskulären Folgeerkrankungen weisen epidemiologische Daten eine Gesamtletalität von 25 % auf; (siehe Strauer, B.E. Das Hochdruckherz, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1991. pp. 1-241).

25 Eine endotheliale Dysfunktion, die als wesentlicher Schrittmacher einer Arteriosklerose definiert werden konnte, ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht durch einen klinischen Routineparameter erfaßbar. Unter dem Gesamtaspekt einer frühzeitigen Diagnose als auch einer differentialtherapeutischen Beeinflussung einer solchen endothelialen Dysfunktion ist somit ein zuverlässiges Detektionsverfahren für den Bereich der kardiovaskulären Medizin wünschenswert.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, eine pharmazeutische Zusammensetzung einer sterilen, injizierbaren physiologisch annehmbaren Lösung mit einem Gehalt an NO, ein Verfahren zu ihrer Herstellung sowie ein Detektionsverfahren für physiologisch präsent

5 NO zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wurde, wie nachstehend erläutert und wie sich aus den Patentansprüchen ergibt, gelöst.

10 Nach einer Ausführungsform der Erfindung besteht die pharmazeutische Zusammensetzung aus 0,9 %-iger mit NO gesättigter physiologischer Natriumchlorid-Lösung.

Bei der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung nimmt die Sättigungskonzentration des NO in der 0,9 %-igen Natriumchloridlösung mit zunehmender Temperatur
15 differentiell ab.

Nach einer besonders vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung betragen die Werte der Sättigungskonzentration mit NO der 0,9 %-igen Natriumchlorid-Lösung bei 0°C 3,26 NO [$\mu\text{mol/l}$], bei 25°C 1,85 NO [$\mu\text{mol/l}$], bei 37°C 1,52 NO [$\mu\text{mol/l}$] und bei 50°C 1,26 NO
20 [$\mu\text{mol/l}$].

Die pharmazeutische Zusammensetzung wird erfindungsgemäß hergestellt, indem unter Sauerstoffausschluß Argon durch eine sterile, injizierbare 0,9 %-ige Natriumchloridlösung geleitet wird, bis jeglicher Restsauerstoffgehalt entfernt ist und anschließend bis zur Sättigungskonzentration des NO in der 0,9 %-igen Natriumchloridlösung NO durch diese geleitet
25 wird.

Die erfindungsgemäße NO-Lösung kann nach einer weiteren Ausführungsform der Erfindung zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung der
30 endothelialen Dysfunktion bei Säugern verwendet werden.

Das nachfolgende Ausführungsbeispiel 1 erläutert den Aufbau der Vorrichtung zur Herstellung einer sterilen, injizierbaren NO-Lösung und ihre Herstellung.

Ausführungsbeispiel 1

a) Konfiguration der Vorrichtung

5

Die Konfiguration der Vorrichtung ist in der Zeichnung 1 wiedergegeben. In ihr bedeuten:

10

- 1 NO 3,0-Reservoir (AGA);
- 2 Argon 5,0-Reservoir (Linde);
- 3 Gaswaschflasche mit Pyrogallol 5 % (Pyrogallol z.A. 612, Merck) in gesättigter KOH (w.v.);
- 4 Gaswaschflasche mit KOH z.A. 5033, (Merck), 20 %;
- 5 Gaswaschflasche, trocken;
- 6 Dreihalsrundkolben (250 ml), beladen mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung mit 3 Schliffeinsätzen, in denen jeweils eingebaut sind:

15

20

- a) Abschlußhahn
- b) Luer-Lock 3-Wegehahn
- c) 3-Wegehahn

- 7 Gaswaschflasche, leer, als Wasserfalle;
- 8 Gaswaschflasche mit KOH z.A. 5033 (Merck), als Wasserfalle;

25

- A kennzeichnet die jeweiligen gasdichten Glasschliffe;
- B gasdichter Dreiwegehahn;
- C kennzeichnet die gasdichten Glasschliffe;
- D gasdichter Dreiwegehahn;
- E gasdichte Glasschliffe zur Verbindung der jeweiligen Gaswaschflaschen

30

Alle Geräteteile sind mit gasdichten Schläuchen (Typ Tygon R 3603) verbunden. Als Dichtungen werden Teflondichtungen Plastibrand (Brand) und als Filter solche vom Typ Millex GS, 0,2 µm (Millipore) verwendet.

b) Herstellung einer sterilen NO-Lösung

Sämtliche Glasgeräte werden mittels konzentrierter Natronlauge (NaOH) gereinigt und jeweils 10 mal mit Aqua bidestillata und HPLC-Wasser nachgespült. Dann werden die nacheinander geschalteten Gaswaschflaschen (3), (4), (5), von denen in (3) Pyrogallol (5 %) in gesättigter KOH (w:v) zur Entfernung von Sauerstoffspuren, in (4) 20 %-ige KOH zur Entfernung höherer Stickoxide vorgelegt sind und (5) trocken ist, und der damit verbundene Dreihalsrundkolben in dem NaCl-Lösung (0,9 %) vorgelegt ist, für 45 min. mit Argon begast.

Der innerhalb des Steigrohres befindliche Teil der NaCl-Lösung wird verworfen. Aus einer sterilen, gasdichten Spritze und den zugehörigen Leitungssystemen sowie Filtern wird der Sauerstoff durch einen sterilen 0,2 µm Filter mittels Argon entfernt und das für die Verdünnung der NO-Lösung notwendige NaCl-Volumen in die sauerstofffreie, gasdichte Spritze abgenommen. Schließlich wird die Anlage für 45 min. mit Stickstoffmonoxid (NO) begast.

Aus den Filtern und Leitungssystemen, die zu der Spritze mit der vorgelegten Verdünnungslösung führen, wird der Sauerstoff erneut mit Argon vollständig entfernt. Der innerhalb des Steigrohres befindliche Teil der NO-Lösung wird verworfen und danach das gesamte Leitungssystem und der sterile Filter mit NO-Lösung durchgespült. Das an NO-Lösung nötige Volumen wird sofort in das mit vorgelegter NaCl-Lösung vorbereitete gasdichte Primärpackmittel über den Dreiwegehahn (B) durch sterile Filter übernommen, das jeweils eine Ampulle, Vial, Spritze etc. sein kann.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist ein Detektionsverfahren zur quantitativen Erfassung einer endothelialen Dysfunktion an Säugern.

Denn bisher konnte eine endotheliale Dysfunktion bei Patienten mit arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus und/oder Hyperlipoproteinämie nur durch aufwendig diagnostische Maßnahmen wie eine arterielle Punktion mit nachfolgender lokaler Applikation von Acetylcholin und hämodynamischer Quantifizierung der daraus folgenden Flußantwort im untersuchten Stromgebiet im Vergleich zu einem altersentsprechenden Normalkollektiv gesichert werden; (siehe Calver, A., Collier, J., and Vallance, P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent

diabetes. J.Clin.Invest. 90:2548-2554, 1992; Creager, M.A., Cooke, J.P., Mendelsohn, M.E., Gallagher, S.J., Coleman, S.M., Loscalzo, J., and Dzau, V.J. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. J.Clin.Invest. 86:228-234, 1990; Kelm, M., Preik, M., Motz, W., and Strauer, B.E. Endotheliale Funktion bei Patienten mit arterieller Hypertonie. In: Zelluläre Mechanismen der Herz-Kreislaufregulation, edited by Ganten, D., Stuttgart: Schattauer, 1993, p. 139-150; Linder, L., Kiowski, W., Bühler, F.R., and Lüscher, T.F. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Circulation 81: 1762-1767, 1990; Panza, J.A., Epstein, S.E., and Quyyumi, A.A. Circadian variation in vascular tone and its relation to a sympathetic vasoconstrictor activity. N.Engl.J.Med 325: 986-990, 1991).

Ferner wurde versucht, in Longitudinalstudien über diesen rein phänomenologischen Ansatz eine mögliche therapeutische Beeinflussung einer endothelialen Dysfunktion z.B. bei Patienten mit arterieller Hypertonie durch eine blutdrucksenkende Therapie mit ACE-Hemmern zu dokumentieren, was jedoch aufgrund der großen methodischen Streubreite des Untersuchungsansatzes nicht gelang; (siehe Creager, M.A. and Roddy, M.-A. Effect of captopril and enalapril on endothelial function in hypertensive patients. Hypertension 24: 499-505, 1994).

Ferner kann über den rein phänomenologischen Ansatz einer geänderten Acetylcholin-abhängigen Flußantwort nicht differenziert werden, inwieweit einer arteriosklerotisch bedingten endothelialen Dysfunktion eine verminderte NO-Synthese und/oder ein vermehrter NO-Abbau zugrunde liegt; (siehe Kelm, M., Preik, M., Köster, A., Heinzelmann, A., Motz, W., and Strauer, B.E. Reduced nitric oxide dependent vasodilation following application of organic nitrates in essential hypertension. In: The biology of nitric oxide, edited by Moncada, S., London: Portland Press Ltd., 1994, p. 509-513; Kelm, M., Feelisch M., Krebber, T., Deussen, A., Motz, W., and Strauer, B.E. The role of nitric oxide (NO) in the regulation of coronary vascular tone in hearts from hypertensive rats: maintenance of NO forming capacity and increased basal production of NO. Hypertension, 25: 186-193, 1995; Kelm, M., Preik, M., Hafner, D., Strauer, B.E. Evidence for a multifactorial process involved in the impaired flow responses to nitric oxide in hypertensive patients with endothelial dysfunction. Hypertension, im Druck 1996).

Das erfindungsgemäße Detektionsverfahren erlaubt die Messung des Gehalts von Nitrit im Vollblut von Säugern, insbesondere im menschlichen Vollblut, wobei Nitrit der spezifische Marker der Aktivität der endothelialen konstitutiven NO-Synthase im menschlichen Kreislauf ist.

Das nachfolgend genannte Ausführungsbeispiel 2 erläutert das Detektionsverfahren.

Ausführungsbeispiel 2

Verfahren zur Nitritbestimmung in humanem Vollblut

1 ml Blut wird in eine Spritze mit 1 ml vorgelegter Stopplösung aus 1 mol/L konzentrierter NaOH verbracht und unmittelbar anschließend 50 µl einer 1 mol/L konzentrierten Phosphorsäure (H₃PO₄) zur Neutralisation des erhaltenen Blut/NaOH-Gemisches zugegeben. Dieses Gemisch wird 5 min. mit 10.000 g in einer Zentrifuge (Universal 30RF, Fa. Hettich) zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wird in Ultrafiltrationsröhrchen (Sartorius cut-off 10.000) dekantiert. Es wird erneut 15 min. mit 2.000 g (Eppendorffzentrifuge 5402 C, Fa. Eppendorf) zentrifugiert. Das erhaltene wasserklare Ultrafiltrat wird in 1,5 ml Volumen fassende Reaktionsgefäße übernommen und mit HPLC-Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Daran schließt sich entweder unmittelbar die Analyse an oder die erhaltenen Proben werden bei -80°C für die Dauer eines Monats gelagert.

Pharmakologische Untersuchungen

1. Nitrit als spezifisches Diagnostikum der cNOS

Es wurden die eigenen Erkenntnisse zum Metabolismus von NO im menschlichen Kreislauf zugrunde gelegt und darauf aufbauend Nitrit als spezifischer Marker der Aktivität der endothelialen konstitutiven NO-Synthase exakt und valide vermessen.

Es wurde die im Ausführungsbeispiel 2 genannte spezifische Stopplösung eingesetzt, die es ermöglicht, die rasche Konversion von Nitrit zu Nitrat im menschlichen Blut zu unterbinden, ohne daß es dadurch während der Probenaufarbeitung zu einem wesentlichen Verlust von Nitrit kommt und die Recovery für Nitrit nach Aufarbeitung und anschließender Vermessung der Probe gegeben war. Ferner wurde nachfolgend eine hochsensitive Meßmethodik entwickelt, welche mittels kombinierter ultravioletter und elektrochemischer Detektion, integriert in einer 2 Kanal-HPLC-Anlage, die simultane und hochsensitive Quantifizierung von Nitrit und Nitrat in Proben menschlichen Vollblutes bzw. des von Säugern ermöglicht. Folgende Resultate wurden mit Probanden erzielt:

In Übereinstimmung mit experimentellen Studien, welche eine unterschiedliche NO-Produktion in arteriellen und venösen Endothelzellen unter Basalbedingungen zeigten, konnte am Menschen in arteriellen Blutproben eine höhere Nitritkonzentration (1310 ± 50 nmol/l) im Vergleich zu Proben aus venösen Stromgebieten (1100 ± 40 nmol/l) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten, wie bereits oben angesprochen, die Serumwerte für Nitrat keine spezifischen Unterschiede und betrugen im Mittel 42 ± 6 µmol/l sowohl in Proben aus dem arteriellen als auch dem venösen Teil des menschlichen Kreislaufes (n=5). Darüber hinaus konnte am Modell der Unterarmzirkulation des Menschen gezeigt werden, daß lokale Infusion der Endothel-abhängigen Dilatoren Acetylcholin und Bradykinin in die A. brachialis dosisabhängig zu einem mehr als vierfachen Anstieg des Ruheflusses führt (n=7). Während dieses Flußanstieges konnte dosisabhängig für beide Mediatoren spezifisch ein Anstieg der Serumkonzentration an Nitrit in Proben aus der Vena cubitalis dokumentiert werden. Somit kam es trotz eines mehr als vierfachen Anstieges des Blutflusses in dem Stromgebiet des Unterarmes zu einer spezifischen Erhöhung der Serumkonzentration an Nitrit nach Infusion beider Stimulatoren der konstitutiven endothelialen NO-Synthase. Dies bedeutet, daß Nitrit spezifisch und dosisabhängig eine gesteigerte endotheliale NO-Produktion in diesem Stromgebiet widerspiegelt. Darüber hinaus konnte für beide Substanzen eine hochsignifikante Korrelation zwischen dem Flußanstieg und dem Anstieg der Konzentration an Nitrit im Serum als auch der Freisetzungsrate über das Unterarmstromgebiet nachgewiesen werden (siehe Zeichnung 2 und 3). Außerdem konnte in Kontrollversuchen gezeigt werden, daß der Endothel-unabhängige Vasodilatator Papaverin zu einem vergleichbaren Anstieg des Blutflusses um den Faktor 4 führte, ohne daß es nachweislich zu einem Anstieg der Serumkonzentration an Nitrit kam. Ferner konnte durch zeitgleiche Infusion von L-NMMA als stereospezifischem Inhibitor der konstitutiven endothelialen NO-Synthase (6 µmol/min) eine 40

%ige Reduktion der Flußantwort und der Serumkonzentration an Nitrit im Vergleich zu Kontrollbedingungen (n=3) nachgewiesen werden. Zusammenfassend belegen diese Untersuchungen, daß es mit der entwickelten Methodik erstmalig möglich ist, lokal und spezifisch die Aktivität der endothelialen konstitutiven NO-Synthase im Gefäßsystem zu quantifizieren und somit ihren Funktionszustand im Hinblick auf eine endotheliale Dysfunktion zu diagnostizieren.

2. Therapie mit erfindungsgemäßen authentischen NO-Lösungen im Kreislauf von Säugern, speziell im menschlichen Kreislauf

Aufgrund des raschen Metabolismus von NO im menschlichen Kreislauf können die erfindungsgemäßen authentischen NO-Lösungen als therapeutisches Mittel eingesetzt werden, um lokal sehr hohe Wirkungskonzentrationen an NO erzielen zu können, ohne zeitgleiche delitäre systemische Nebenwirkungen auszulösen.

Es wurde das Modell der Unterarmzirkulation gewählt und wäßrige NO-Standards in aufsteigenden Dosierungen Probanden lokal appliziert. Aufgrund des Metabolismus von NO im menschlichen Blut eignet sich hierfür nicht eine kontinuierliche Infusion, sondern wesentlich effektiver ist die Bolus-Technik. Die Konzentrationen der gewählten Stammlösung und die Kinetik der Applikation müssen so gewählt werden, daß ein klar umschriebener Bolus der wäßrigen NO-Lösung, entsprechend dem zirkulären Kreislaufvolumen und der Transitzeit von der Applikationsstelle bis zu den Widerstandsarterien, reproduzierbar das anvisierte Stromgebiet erreicht. Wie in Zeichnungen 4 und 5 zu sehen ist, konnte mittels dieser Bolus-Technik NO reproduzierbar zu einem dosisabhängigen Anstieg des Blutflusses sowohl im Maximum als auch über die Fläche unter der Kurve der Flußantwort führen, ohne daß es systemisch nachweisbar zu einem Abfall des Blutdruckes kam. Ferner konnte in zusätzlichen toxikologischen Untersuchungen gezeigt werden, daß es in den verwandten Dosen zu keiner berichteten Veränderung des Methämoglobingehaltes im Blut der Probanden unter der NO-Applikation während der Untersuchung gekommen war. Zusätzlich konnte noch unter Anwendung der oben beschriebenen Stopplösung gezeigt werden, daß es unter der NO-Applikation in diesem regionalen Stromgebiet zu einem Anstieg der Serumnitritkonzentration in der Vena cubitalis um 111 ± 12 % kam, während sich die Serumkonzentration für Nitrat (45 ± 8 µmol/l) nicht signifikant unter der Intervention änderte. Die lokale Flußantwort auf diesen in Bolus-Technik applizierten wäßrigen NO-Standard korrelierte hochsignifikant mit der Körperoberfläche der einzelnen Probanden und war unabhängig von der Höhe der Herzfrequenz oder des arteriellen systemischen Blutdruckes.

3. Erläuterungen zu den Zeichnungen 2 bis 5

Zeichnung 2

- 5 Beziehung zwischen Änderungen des Blutflusses im Unterarm (FBF) und der Serumkonzentration an Nitrit (A) sowie der Freisetzungsrates an NO bzw. Nitrit in die Unterarmzirkulation nach lokaler intraarterieller Infusion aufsteigender Dosen von Acetylcholin (Daten aus Abb. 1). Die lineare Regressionsanalyse ergab ein $r = 0,997$ und ein $P = 0,003$.

10

Zeichnung 3

- Beziehung zwischen Änderungen des Blutflusses im Unterarm (FBF) und der Serumkonzentration an Nitrit (A) sowie der Freisetzungsrates an NO bzw. Nitrit in die Unterarmzirkulation nach lokaler intraarterieller Infusion aufsteigender Dosen von Bradykinin (Daten aus Abb. 2).
- 15 Die lineare Regressionsanalyse ergab ein $r = 0,985$ und ein $P = 0,001$.

Zeichnung 4

- Dosisantwortkurve für die NO-induzierte Vasodilatation in der Unterarmzirkulation. Aufgetragen ist der plethysmographisch bestimmte Anstieg des Blutflusses im Unterarm (FBF) gegen die Dosis an NO, welche in Bolus-Technik aus salinen Standards von NO-Lösungen appliziert wurde ($n=6$, Mittelwert \pm SEM).

Zeichnung 5

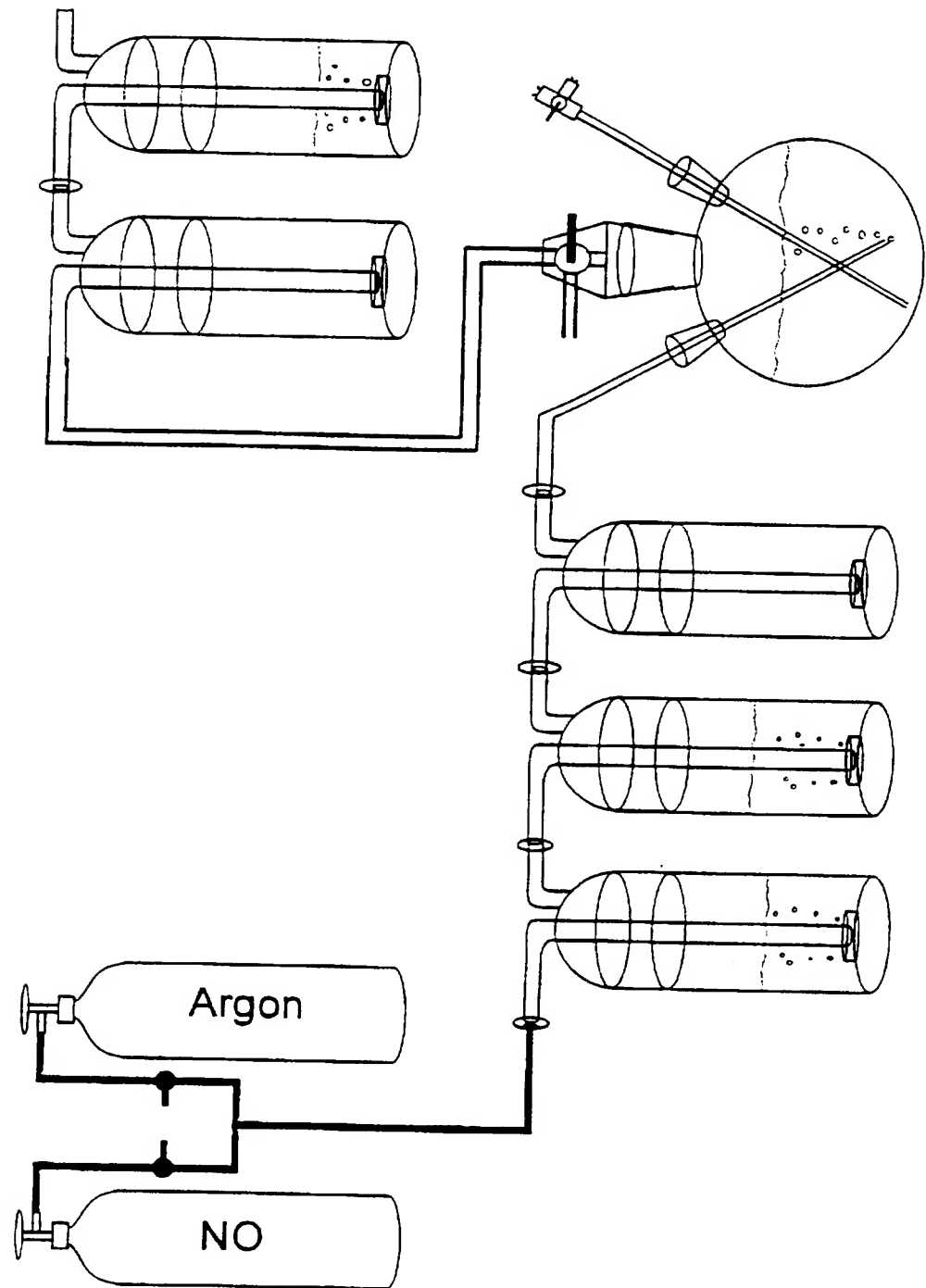
- 25 Dosisantwortkurve für die NO-induzierte Vasodilatation in der Unterarmzirkulation. Aufgetragen ist die Fläche unter der Kurve für die Änderungen des FBF, gleiche Probanden wie in Zeichnung 4/5 ($n=6$, Mittelwert \pm SEM).

Patentansprüche

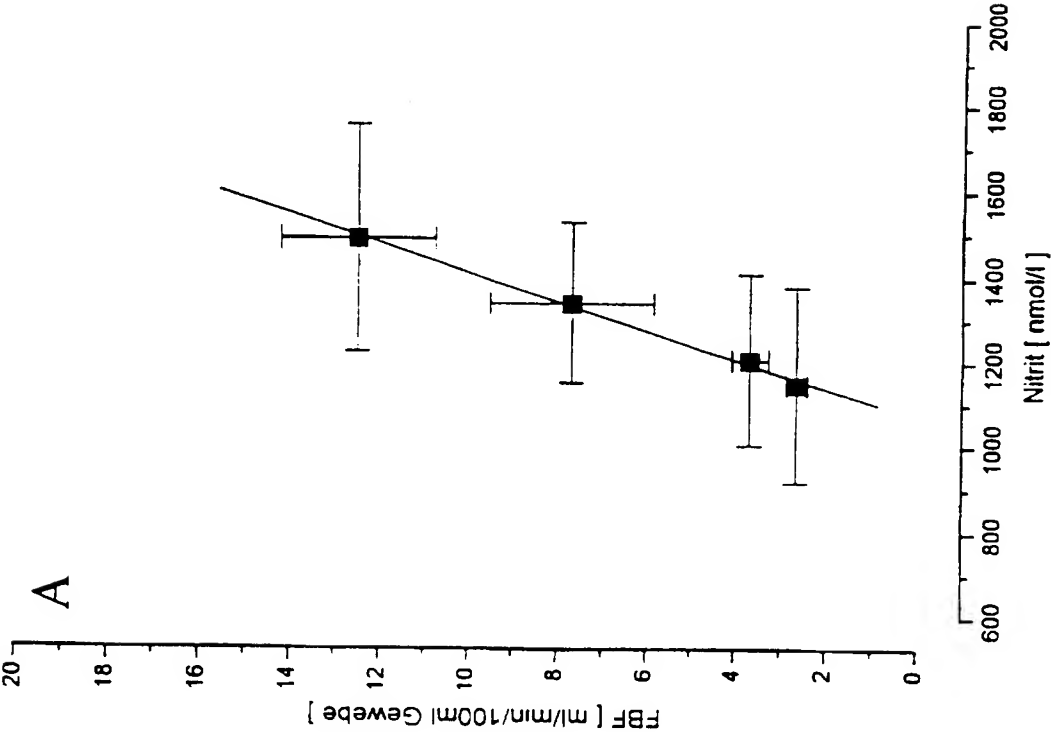
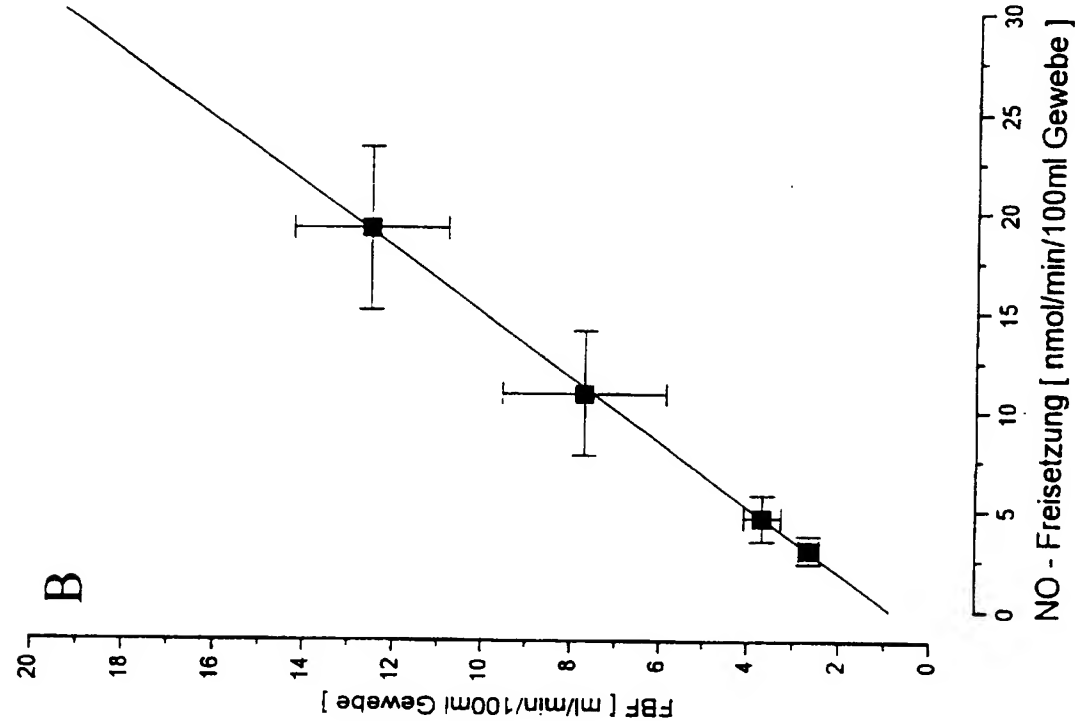
- 5 1. Pharmazeutische Zusammensetzung einer sterilen, injizierbaren physiologisch annehmbaren Lösung, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen mit zunehmender Temperatur abnehmenden Gehalt an Stickstoffmonoxid (NO) aufweist, frei von Sauerstoff ist und aus 0,9 %-iger, mit NO gesättigter Natriumchlorid-Lösung besteht.
- 10 2. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Sättigungskonzentration des NO in der 0,9 %-igen Natriumchloridlösung mit zunehmender Temperatur differentiell abnimmt.
- 15 3. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Sättigungskonzentration mit NO der 0,9 %-igen Natriumchlorid-Lösung bei 0°C 3,26 NO [$\mu\text{mol/l}$], bei 25°C 1,85 NO [$\mu\text{mol/l}$], bei 37°C 1,52 NO [$\mu\text{mol/l}$] und bei 50°C 1,26 NO [$\mu\text{mol/l}$] beträgt.
- 20 4. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Ansprüchen 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß unter Sauerstoffausschluß Argon durch eine sterile, injizierbare 0,9 %-ige Natriumchloridlösung geleitet wird, bis jeglicher Restsauerstoffgehalt entfernt ist und anschließend bis zur Sättigungskonzentration des NO in der 0,9 %-igen Natriumchloridlösung NO durch diese geleitet wird.
- 25 5. Verwendung einer sterilen, injizierbaren physiologisch annehmbaren Lösung, die frei von Sauerstoff ist und aus 0,9 %-iger mit NO gesättigter Natriumchlorid-Lösung besteht, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Ansprüchen 1-3 zur Behandlung der endothelialen Dysfunktion bei Säugern.

6. Detektionsverfahren zur quantitativen Erfassung einer endothelialen Dysfunktion an Säugern, dadurch gekennzeichnet, daß ein abgemessenes Volumen an Vollblut unter weitgehendem Sauerstoffausschluß in ein gleiches Volumen einer Stopplösung aus konzentrierter NaOH (1 mol/l) verbracht wird, 50 µl konzentrierte Phosphorsäure (1 mol/l) zugegeben wird, anschließend 5 min. mit 10.000 g zentrifugiert wird, der erhaltene Überstand in Ultrafiltrationsröhrchen dekantiert wird und erneut für 15 min. mit 2.000 g zentrifugiert wird, anschließend das erhaltene Ultrafiltrat mit HPLC-Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt wird und in dann bekannter Weise der Gehalt an Nitrit bestimmt wird.

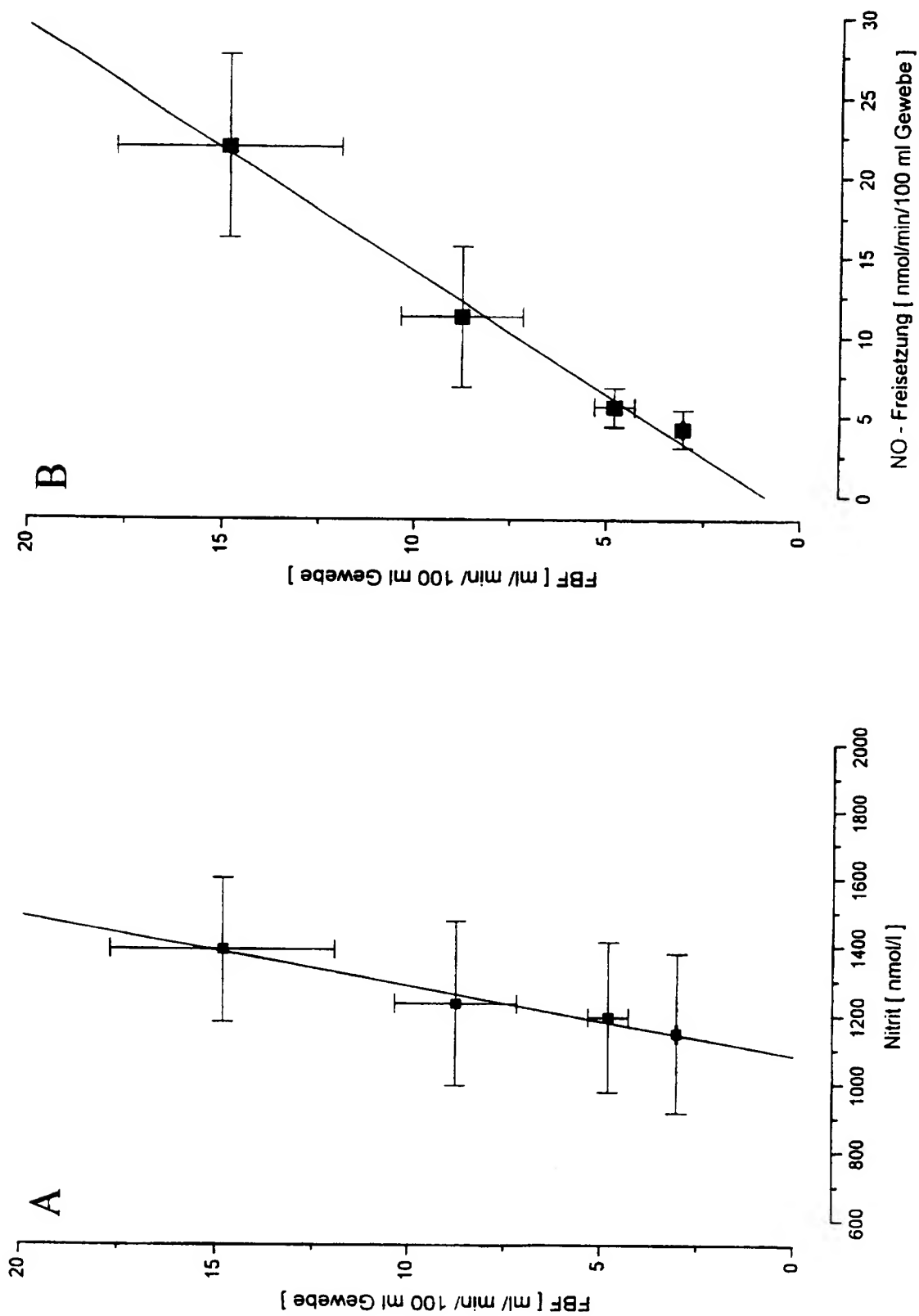
Anlage zur Herstellung authentischer NO-Lösungen



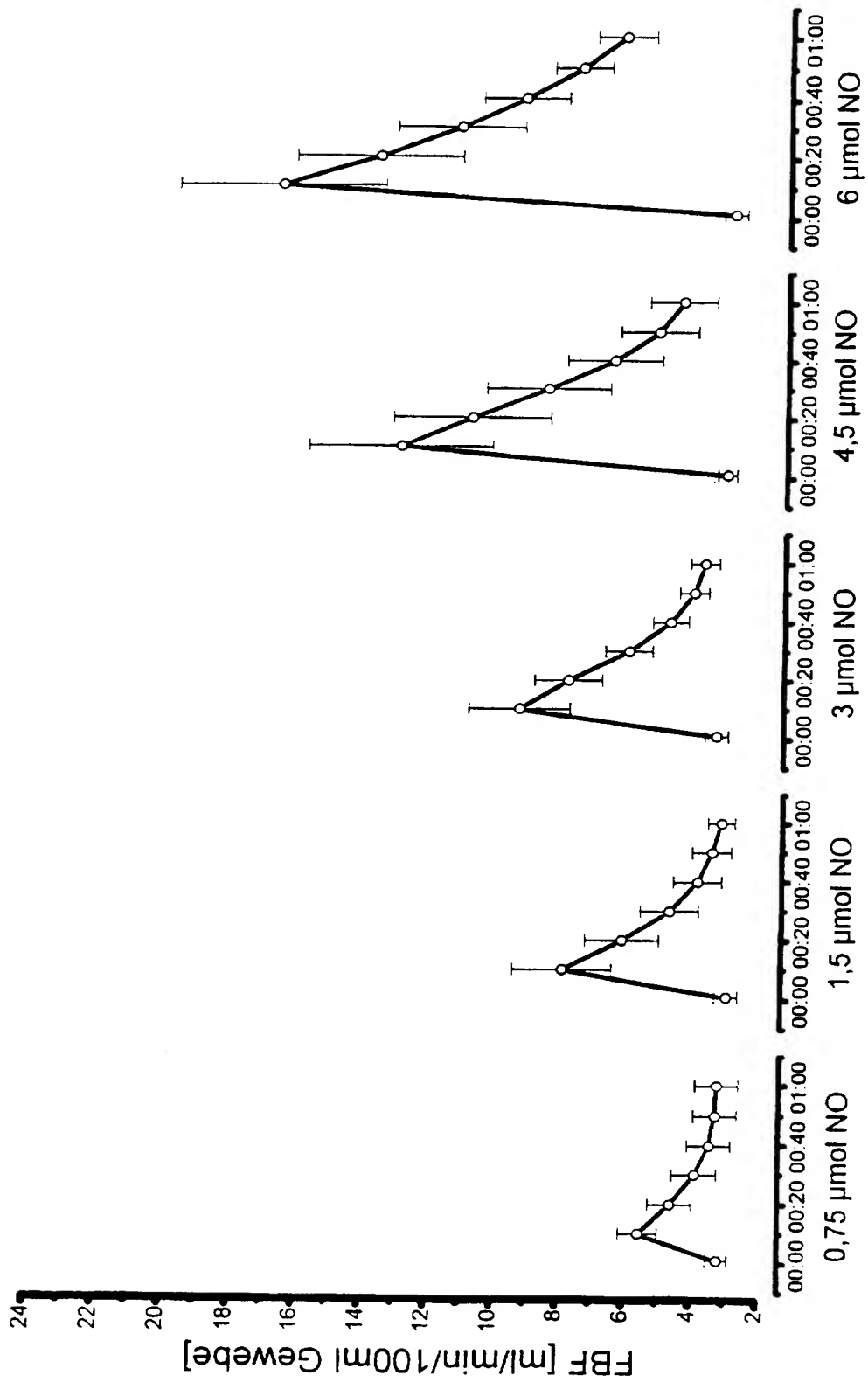
2/7



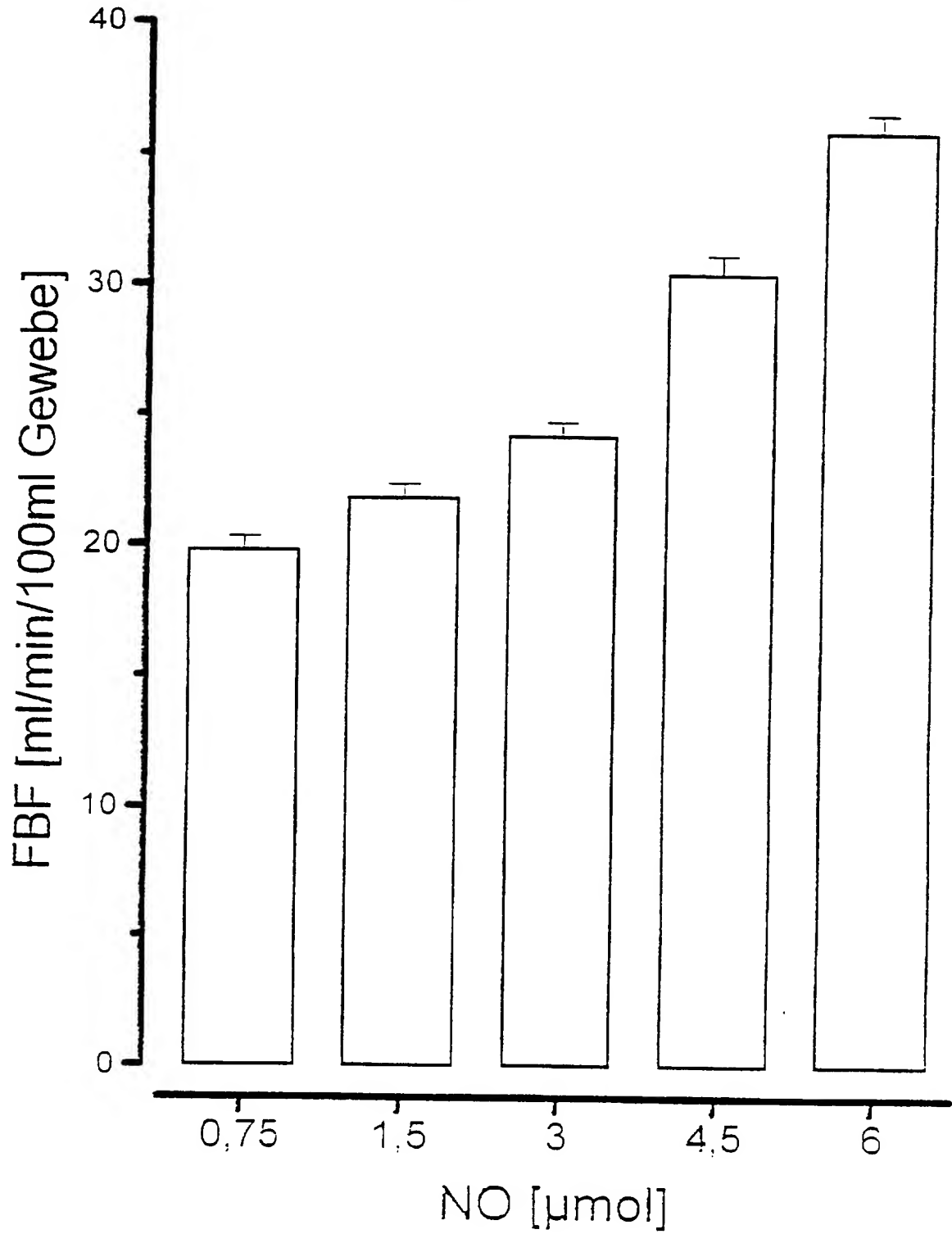
3/7



4/7



5/7



6/7

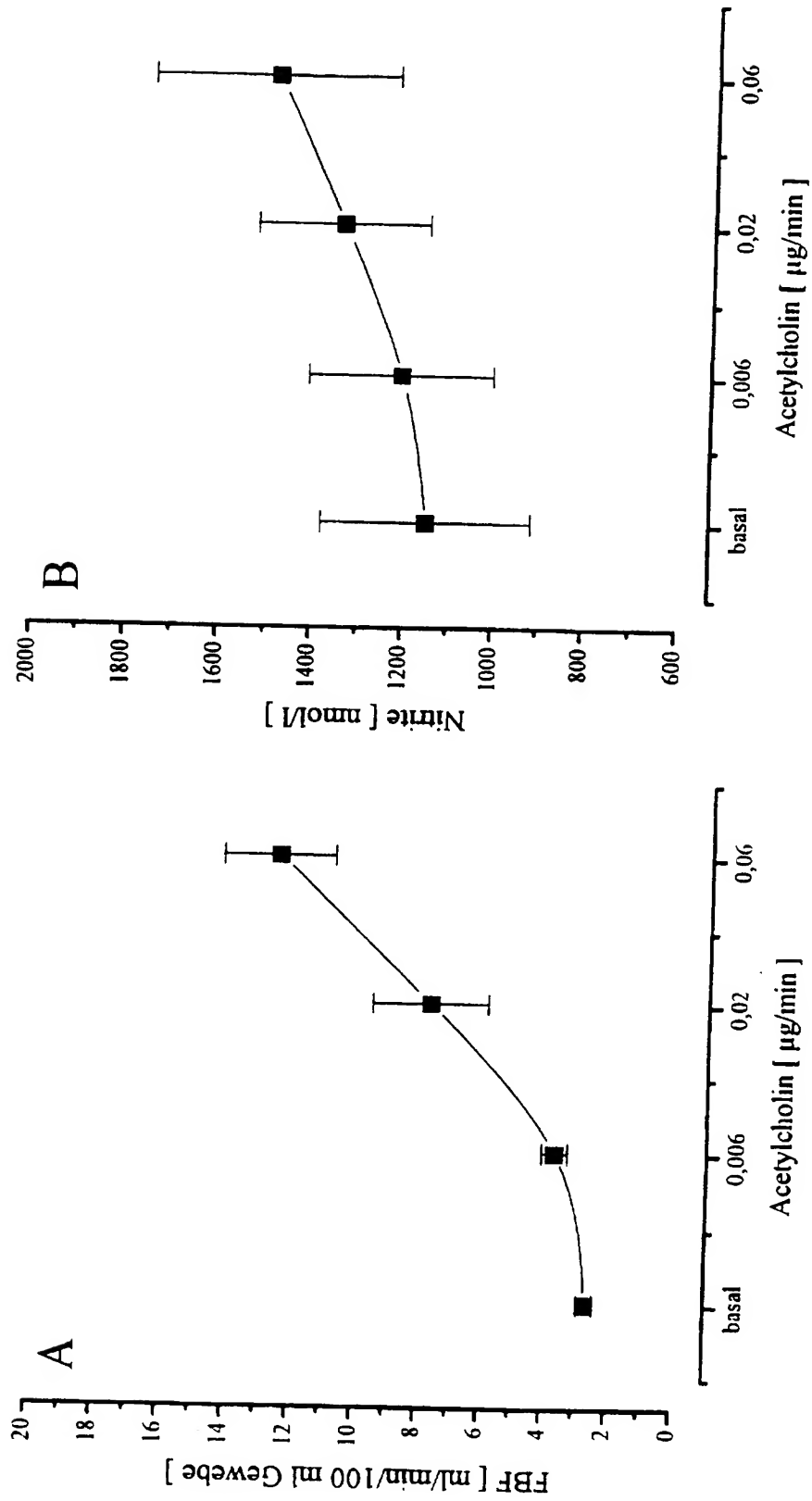


Abb. 1

7/7

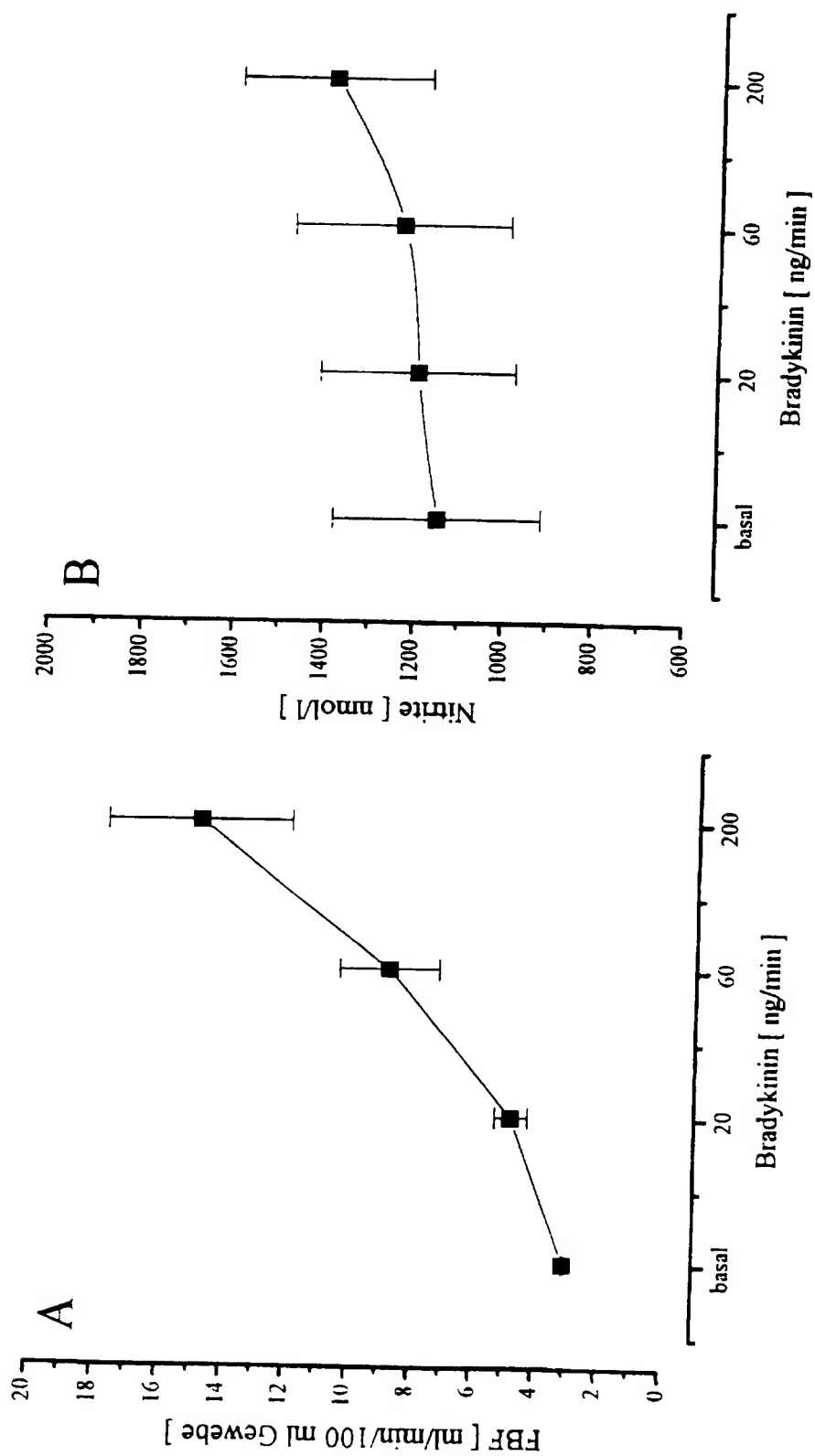


Abb. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In .national Application No
PCT/EP 97/00482

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K33/00 G01N33/84

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 00180 A (GEN HOSPITAL CORP) 6 January 1994 see page 5, line 27 - page 6, line 6 see page 18, line 5 - page 19, line 20 ---	1-3,5
X	HYPERTENSION, vol. 25, no. 2, 1995, DALLAS, pages 186-193, XP000675358 KELM M. ET AL: "Role of nitric acid in the regulation of coronary vascular tone in hearts from hypertensive rats. Maintenance of nitric oxide-forming capacity and increased basal production of nitric oxide" see page 187 --- -/--	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 June 1997

Date of mailing of the international search report

30.06.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Boulois, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. tional Application No
PCT/EP 97/00482

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. CARDIOVASCULAR PHARMACOLOGY, vol. 17, no. sup3, 1991, NEW YORK, pages 25-33, XP000675364 FEELISCH M.: "The biochemical Pathways of Nitric Oxide Formation from Nitrovasodilators : Appropriate Choice of Exogenous NO Donors and Aspects of Preparation and Handling of Aqueous NO Solutions" cited in the application see page 27 ---	1-5
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 9534 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B07, AN 95-261218 XP002032977 & JP 07 165 610 A (MAEDA H.) , 27 June 1995 see abstract ---	1
A	EUR. J. OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY, vol. 7, no. 3, March 1995, pages 227-230, XP000675561 REES D.C. ET AL: "Are Serum Concentrations of Nitric Oxide Metabolites Useful for Predicing the Clinical Outcome of Severe Ulcerative Colitis ?" see page 228 ---	6
A	NEUROPROTOCOLS, vol. 1, no. 2, 1992, pages 125-131, XP000675631 W. ROSS TRACEY: "Spectrophotometric Detection of Nitrogen Oxides Using Azo Dyes" see page 125 ---	
A	J. OF CHROMATOGRAPHY, vol. 706, no. 1 2, 1995, pages 437-442, XP000676127 EVERETT S.A. ET AL: "Nitric Oxide in Biologocal Fluids: Analysis of Nitrite and Nitrate by High-Performance Ion Chromatography" see page 437 -----	6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/00482

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9400180 A	06-01-94	US 5536241 A AU 4651693 A	16-07-96 24-01-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In tionale Aktenzeichen
PCT/EP 97/00482

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K33/00 G01N33/84

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A61K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 94 00180 A (GEN HOSPITAL CORP) 6. Januar 1994 siehe Seite 5, Zeile 27 - Seite 6, Zeile 6 siehe Seite 18, Zeile 5 - Seite 19, Zeile 20 ---	1-3,5
X	HYPERTENSION, Bd. 25, Nr. 2, 1995, DALLAS, Seiten 186-193, XP000675358 KELM M. ET AL: "Role of nitric acid in the regulation of coronary vascular tone in hearts from hypertensive rats. Maintenance of nitric oxide-forming capacity and increased basal production of nitric oxide" siehe Seite 187 --- -/-	1-6

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
 - "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
 - "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
 - "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
 - "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
 - "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 13. Juni 1997	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 30.06.97
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Boulois, D

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In tionales Aktenzeichen
PCT/EP 97/00482

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	J. CARDIOVASCULAR PHARMACOLOGY, Bd. 17, Nr. sup3, 1991, NEW YORK, Seiten 25-33, XP000675364 FEELISCH M.: "The biochemical Pathways of Nitric Oxide Formation from Nitrovasodilators : Appropriate Choice of Exogenous NO Donors and Aspects of Preparation and Handling of Aqueous NO Solutions" in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 27 ---	1-5
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 9534 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B07, AN 95-261218 XP002032977 & JP 07 165 610 A (MAEDA H.) , 27.Juni 1995 siehe Zusammenfassung ---	1
A	EUR. J. OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY, Bd. 7, Nr. 3, März 1995, Seiten 227-230, XP000675561 REES D.C. ET AL: "Are Serum Concentrations of Nitric Oxide Metabolites Useful for Predicing the Clinical Outcome of Severe Ulcerative Colitis ?" siehe Seite 228 ---	6
A	NEUROPROTOCOLS, Bd. 1, Nr. 2, 1992, Seiten 125-131, XP000675631 W. ROSS TRACEY: "Spectrophotometric Detection of Nitrogen Oxides Using Azo Dyes" siehe Seite 125 ---	
A	J. OF CHROMATOGRAPHY, Bd. 706, Nr. 1 2, 1995, Seiten 437-442, XP000676127 EVERETT S.A. ET AL: "Nitric Oxide in Biologocal Fluids: Analysis of Nitrite and Nitrate by High-Performance Ion Chromatography" siehe Seite 437 -----	6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/00482

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9400180 A	06-01-94	US 5536241 A	16-07-96
		AU 4651693 A	24-01-94
